



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 11 月 10 日 (10.11.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/105998 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/13, A61K  
31/7088, 39/395, 48/00, A61P 25/28, C07K 16/18, C12N  
1/15, 1/19, 1/21, 5/00, C12P 21/02, G01N 33/563

(74) 代理人: 河宮 治, 外(KAWAMIYA, Osamu et al.): 〒  
5400001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号  
IMP ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/007628

(22) 国際出願日: 2005 年 4 月 21 日 (21.04.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2004-131839 2004 年 4 月 27 日 (27.04.2004) JP  
特願 2004-300590  
2004 年 10 月 14 日 (14.10.2004) JP  
特願 2004-343945  
2004 年 11 月 29 日 (29.11.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財  
団法人化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUN-  
DATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RE-  
SEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒8608568 熊本県熊  
本市大窪一丁目 6 番 1 号 Kumamoto (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 杉村 和久 (SUG-  
IMURA, Kazuhisa) [JP/JP]; 〒8910103 鹿児島県鹿児  
島市皇徳寺台 5-20-5 Kagoshima (JP). 中島 敏  
博 (NAKASHIMA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒8691298 熊本  
県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番地 1 財団法人化学及血  
清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,  
NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,  
SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護  
が可能): ARIPO (BW, GI, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,  
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,  
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部  
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

WO 2005/105998 A1

(54) Title: HUMAN ANTIAMYLOID  $\beta$  PEPTIDE ANTIBODY AND ANTIBODY FRAGMENT THEREOF

(54) 発明の名称: ヒト抗アミロイド  $\beta$  ペプチド抗体およびその抗体フラグメント

(57) Abstract: It is intended to provide a human amyloid  $\beta$  peptide (hereinafter referred to as A  $\beta$ ) antibody which binds to A  $\beta$  and inhibits the aggregation of A  $\beta$  molecules, and its antibody fragment. The above-described antibody or its antibody fragment has the variable region of human anti-A  $\beta$  antibody and strongly reacts with A  $\beta$  to thereby exert an effect of inhibiting the aggregation thereof. The above antibody and its antibody fragment are usable as A  $\beta$  detection reagents, preventives/remedies for Alzheimer's disease or diagnostics therefor.

(57) 要約: アミロイド  $\beta$  ペプチド (以下、A  $\beta$  という) に結合し、A  $\beta$  分子の凝集を阻害するヒト抗A  $\beta$  抗体およ  
び該抗体フラグメントを提供する。本発明の抗体および抗体フラグメントは、ヒト抗A  $\beta$  抗体の可変領域を有し、  
A  $\beta$  と強く反応して、その凝集の阻害作用を示す。本発明の抗体および抗体フラグメントは、A  $\beta$  の検出試薬、ア  
ルツハイマー痴呆症の予防・治療薬、または診断薬として使用することができる。

## 明 細 書

ヒト抗アミロイド  $\beta$  ペプチド抗体およびその抗体フラグメント

## 技術分野

- [0001] 本発明は、アミロイド  $\beta$  ペプチド(以下、 $A\beta$  という)に結合し、 $A\beta$  分子の凝集を阻害するヒト抗 $A\beta$  抗体および該抗体フラグメントに関する。当該抗体および抗体フラグメントは、 $A\beta$  分子の凝集体の生成とその細胞毒性が一因と考えられるアルツハイマー痴呆症の診断および治療薬として期待される。

## 背景技術

- [0002] アルツハイマー痴呆症の発症機構の全貌は未だ不明であるが、 $A\beta$  分子の凝集体によるニューロン細胞への毒性が重要な役割を果たしていると考えられている。 $A\beta$  分子凝集体の生成の問題は、 $A\beta$  分子のコンホメーションの問題でもある。
- [0003]  $A\beta$  分子はニューロンアミロイド前駆体タンパクから $\beta$  セクレターゼなどによる切断で生じる分解物で、 $A\beta$  1-40と $A\beta$  1-42(以下、 $A\beta$  42という)の2種が生成するが、 $A\beta$  42の方がより凝集性を有し、疾患および神経毒性と相関していることが報告されている。また脳内の $A\beta$  プラークにはミクログリアやアストロサイトが局在化し、このことが神経毒性とも相関していることが示唆されている。
- [0004]  $A\beta$  の蓄積は、見方を変えれば、個体の加齢プロセスとも考えられ、クリアランスのバランスが崩れて、その敷居値を越えた蓄積が発病に繋がるとの仮説が提唱されている。これらの仮説に基づき $A\beta$  の産生そのものを抑制する目的で前駆体タンパクの切断に関与する $\beta$  セクレターゼの低分子阻害剤などの開発が試みられている。しかし、 $A\beta$  の生成メカニズムは単純ではなく、必ずしも十分な成績が得られているわけではない。
- [0005] 一方、B. Solomonら(非特許文献1)のin vitroにおける抗 $A\beta$  抗体(N末端側の抗体)による $A\beta$  の凝集抑制効果の報告や、Schenkらによる凝集前の $A\beta$  42をマウスにアジュバントと共に投与することにより、脳アミロイド沈着の減少を見いだした報告は新たな免疫療法への道を開いた(非特許文献2)。実際、 $A\beta$  を用いたアルツハイマー痴呆症のワクチン治療法が試みられ、脳アミロイド沈着の減少など一定の発症阻

止活性が明らかにされた(非特許文献3および非特許文献4)。しかし、ワクチン療法では、効果が認められる一方、T細胞の活性化による炎症反応の誘導による深刻な副作用が出現し、未だ安全で有効な予防治療方法として確立できていない。

[0006] A $\beta$  ワクチン療法の効果は、局所で活性化したミクログリア細胞がFc受容体を介して、抗体沈着したA $\beta$  抗原複合体を取り込み、分解する作用と、可溶性のA $\beta$  と結合して、局所での沈着を防ぐ効果が推定されている。

[0007] 一方、McLaurinらはA $\beta$  分子の末端A $\beta$  4-10に対する抗体の受動免疫が、発症を阻止もしくは遅延を誘導する成果をマウスの実験で明らかにしている(非特許文献5)。抗体を移入する受動免疫の場合、T細胞の活性化による炎症反応の誘導の可能性は少ないが、血清中に存在する抗A $\beta$  抗体の0.1%以下しか脳血管関門を通過しないとされており、多量、頻回の投与が必要になると考えられている。

[0008] 非特許文献1: Solomon, B.ら、(1996) Pro. Natl. Acad. Sci., 93, 452-455

非特許文献2: Schenk, D.ら、(1999) Nature, 400, 173

非特許文献3: Nicoll, J. A.ら、(2003) Nature Medicine, 9, 448

非特許文献4: Monson, A.ら、(2003) Science, 302, 834-838

非特許文献5: McLaurinら、(2002) Nature Medicine, 8, 1263-1269

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0009] 副作用の危険性が少なく、多量、頻回の投与に対応するためには、抗体自体の免疫原性が低いことが重要となる。また更に、血液脳関門の通過には低分子化抗体が有利であることが報告されており、A $\beta$  分子に特異的でかつ低分子化可能な完全ヒト抗体が開発できれば、アルツハイマー痴呆症の治療薬として極めて有効であると考えられる。

[0010] さらに、A $\beta$  分子凝集体の生成の問題は、A $\beta$  分子のコンホメーションの問題でもある。従って、構造変換を抑制する或いは制御するような分子、即ちA $\beta$  特異的なシャペロン様分子が共存すれば、十分にA $\beta$  分子凝集体生成を制御できる可能性が考えられる。シャペロン様活性を持つ抗体が報告されており、抗A $\beta$  抗体にこのような活性を併せ持つことも十分に期待できる。

- [0011] さらにアルツハイマー痴呆症の診断では異常A $\beta$ 分子の生成や蓄積を早期に検出するアミロイドイメージング法が注目され、プローブ技術の開発が必須であるが、異常A $\beta$ 分子を高感度でかつ特異的に検出する脳内の画像化技術が開発されていない。脳血管関門を通過でき脳内の異常A $\beta$ 分子の沈着をきわめて早期に発見することができれば、すぐれた診断法となる。

#### 課題を解決するための手段

- [0012] 本発明では以上の知見にもとづき、ヒト抗体ファージディスプレイライブラリーを用いることにより、A $\beta$  42に特異的に結合するヒト抗体の単離を行い、A $\beta$  42に特異的に結合するヒト一本鎖可変領域(scFv)を6種類、また更に通常のscFvと異なり抗体の軽(L)鎖可変領域(VL鎖またはVL)のみでA $\beta$ への結合特異性を有するVL鎖の単離に成功した。さらに、これらのscFvおよびVL鎖が、A $\beta$ の凝集を阻害することを見出し、本発明を完成させるに至った。
- [0013] すなわち、本発明は、医学上または産業上有用な方法・物質として下記1)～32)の発明を含むものである。
- [0014] 1)アミロイド $\beta$ ペプチド(A $\beta$ )に結合性を有するヒト抗A $\beta$ 抗体。
- [0015] 2)H鎖の相補性決定領域(CDR)が以下の(a)または(b)のアミノ酸配列を有し、L鎖の相補性決定領域(CDR)が以下の(c)または(d)のアミノ酸配列を有する、上記1)に記載のヒト抗A $\beta$ 抗体：
- (a)CDR1として配列番号2、12、22、32、42、52、62、72、82または92のいずれか一つ、CDR2として配列番号3、13、23、33、43、53、63、73、83または93のいずれか一つ、およびCDR3として配列番号4、14、24、34、44、54、64、74、84または94のいずれか一つによりそれぞれ示されるアミノ酸配列；
- (b)CDR1～3のアミノ酸配列として、それぞれ、配列番号2～4、12～14、22～24、32～34、42～44、52～54、62～64、72～74、82～84、または92～94、またはこれらアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列であって、A $\beta$ に対するH鎖の相補性決定領域となりうるもの；
- (c)CDR1として配列番号7、17、27、37、47、57、67、77、87、97または102の

いずれか一つ、CDR2として配列番号8、18、28、38、48、58、68、78、88、98または103のいずれか一つ、およびCDR3として配列番号9、19、29、39、49、59、69、79、89、99または104のいずれか一つによりそれぞれ示されるアミノ酸配列；

(d) CDR1～3のアミノ酸配列として、それぞれ、配列番号7～9、17～19、27～29、37～39、47～49、57～59、67～69、77～79、87～89、97～99、または102～104、またはこれらアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列であって、A $\beta$ に対するL鎖の相補性決定領域となりうるもの。

[0016] 3) H鎖のCDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号2～4、12～14、22～24、32～34、42～44、52～54、62～64、72～74、82～84、または92～94の組み合わせから選択されるアミノ酸配列であり、L鎖のCDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号7～9、17～19、27～29、37～39、47～49、57～59、67～69、77～79、87～89、97～99、または102～104の組み合わせから選択されるアミノ酸配列である、上記2)に記載のヒト抗A $\beta$ 抗体。

[0017] 4) H鎖のCDR1～3とL鎖のCDR1～3との組み合わせのアミノ酸配列が、配列番号2～4と配列番号7～9、配列番号12～14と配列番号17～19、配列番号22～24と配列番号27～29、配列番号32～34と配列番号37～39、配列番号42～44と配列番号47～49、配列番号52～54と配列番号57～59、配列番号62～64と配列番号67～69、配列番号72～74と配列番号77～79、配列番号82～84と配列番号87～89、または配列番号92～94と配列番号97～99とのいずれか一つの組み合わせである、上記3)に記載のヒト抗A $\beta$ 抗体。

[0018] 5) H鎖可変領域が以下の(e)または(f)のアミノ酸配列を有し、L鎖可変領域が以下の(g)または(h)のアミノ酸配列を有する、上記1)から4)のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体：

(e) 配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81または91のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列；

(f) 配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81または91に示されるアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加され

たアミノ酸配列であって、A $\beta$ に対するH鎖可変領域となりうるもの；

(g)配列番号6、16、26、36、46、56、66、77、86、96または101のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列；

(h)配列番号6、16、26、36、46、56、66、77、86、96または101に示されるアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列であって、A $\beta$ に対するL鎖可変領域となりうるもの。

[0019] 6) H鎖可変領域とL鎖可変領域との組み合わせのアミノ酸配列が、配列番号1と配列番号6、配列番号11と配列番号16、配列番号21と配列番号26、配列番号31と配列番号36、配列番号41と配列番号46、配列番号51と配列番号56、配列番号61と配列番号66、配列番号71と配列番号76、配列番号81と配列番号86、または配列番号91と配列番号96との組み合わせにより示されるアミノ酸配列である、上記1)から5)のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体。

[0020] 7) 当該A $\beta$ が繊維化したA $\beta$ である上記1)から6)のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体。

[0021] 8) アミロイド $\beta$ ペプチド(A $\beta$ )に結合性を有するヒト抗A $\beta$ 抗体のH鎖可変領域フラグメント。

[0022] 9) 相補性決定領域(CDR)が以下の(a)または(b)のアミノ酸配列を有する、上記8)に記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のH鎖可変領域フラグメント：

(a) CDR1として配列番号2、12、22、32、42、52、62、72、82または92のいずれか一つ、CDR2として配列番号3、13、23、33、43、53、63、73、83または93のいずれか一つ、およびCDR3として配列番号4、14、24、34、44、54、64、74、84または94のいずれか一つによりそれぞれ示されるアミノ酸配列；

(b) CDR1～3のアミノ酸配列として、それぞれ、配列番号2～4、12～14、22～24、32～34、42～44、52～54、62～64、72～74、82～84、または92～94、またはこれらアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列であって、A $\beta$ に対するH鎖の相補性決定領域となりうるもの。

[0023] 10) CDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号2～4、12～14、22～24、32～34、4

2～44、52～54、62～64、72～74、82～84、または92～94の組み合わせから選択されるアミノ酸配列である、上記9)に記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のH鎖可変領域フラグメント。

[0024] 11)以下の(e)または(f)のアミノ酸配列を有する、上記8)から10)のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のH鎖可変領域フラグメント:

(e)配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81または91のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列;

(f)配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81または91に示されるアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、A $\beta$ に対するH鎖可変領域となりうるもの。

[0025] 12)当該A $\beta$ が繊維化したA $\beta$ である上記8)から11)のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のH鎖可変領域フラグメント。

[0026] 13)アミロイド $\beta$ ペプチド(A $\beta$ )に結合性を有するヒト抗A $\beta$ 抗体のL鎖可変領域フラグメント。

[0027] 14)相補性決定領域(CDR)が以下の(c)または(d)のアミノ酸配列を有する、上記13)に記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のL鎖可変領域フラグメント:

(c)CDR1として配列番号7、17、27、37、47、57、67、77、87、97または102のいずれか一つ、CDR2として配列番号8、18、28、38、48、58、68、78、88、98または103のいずれか一つ、およびCDR3として配列番号9、19、29、39、49、59、69、79、89、99または104のいずれか一つによりそれぞれ示されるアミノ酸配列;

(d)CDR1～3のアミノ酸配列として、それぞれ、配列番号7～9、17～19、27～29、37～39、47～49、57～59、67～69、77～79、87～89、97～99、または102～104、またはこれらアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、A $\beta$ に対するL鎖の相補性決定領域となりうるもの。

[0028] 15)CDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号7～9、17～19、27～29、37～39、47～49、57～59、67～69、77～79、87～89、97～99、または102～104の組み合わせから選択されるアミノ酸配列である、上記14)に記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のL鎖

可変領域フラグメント。

[0029] 16) 以下の(g)または(h)のアミノ酸配列を有する、上記8)から10)のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のL鎖可変領域フラグメント:

(g)配列番号6、16、26、36、46、56、66、77、86、96または101のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列;

(h)配列番号6、16、26、36、46、56、66、77、86、96または101に示されるアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、A $\beta$ に対するL鎖可変領域となりうるもの。

[0030] 17) 当該A $\beta$ が繊維化したA $\beta$ である上記13)から16)のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のL鎖可変領域フラグメント。

[0031] 18) 上記8)から12)のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のH鎖可変領域フラグメントと、上記13)から17)のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のL鎖可変領域フラグメントとを連結してなる、A $\beta$ に対するヒト由来の抗体の一本鎖可変領域フラグメント。

[0032] 19) 上記8)から12)のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のH鎖可変領域フラグメント、および/または上記13)から17)のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のL鎖可変領域フラグメントに、ヒト由来の抗体定常領域を連結してなる、A $\beta$ に対するヒト由来の抗体またはその抗体フラグメント。

[0033] 20) 当該抗体フラグメントが、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scAb、またはscFv-Fcである上記19)に記載の抗体フラグメント。

[0034] 21) 配列番号101のアミノ酸配列を有するヒト抗A $\beta$ 抗体のL鎖可変領域フラグメントとヒト由来の抗体定常領域を連結してなるA $\beta$ に対するヒト由来の抗体またはそのフラグメント。

[0035] 22) 上記1)から21)のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメントとペプチド或いは他のタンパク質とを融合させた融合抗体またはそのフラグメント。

[0036] 23) 上記1)から22)のいずれかに記載の抗体もしくは融合抗体またはそのフラグメントに修飾剤が結合されてなる修飾抗体またはそのフラグメント。

[0037] 24) 上記1)から22)のいずれかに記載の抗体もしくは融合抗体またはそのフラグメントをコードする遺伝子。



- [0038] 25) 上記24)に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。
- [0039] 26) 上記24)に記載の遺伝子が導入された形質転換体。
- [0040] 27) 上記24)に記載の遺伝子を宿主に発現させることによって、ヒト抗A $\beta$ 抗体またはその断片を生産する方法。
- [0041] 28) 上記24)に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。
- [0042] 29) 上記1)から21)のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、または上記22)に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または上記23)に記載の修飾抗体またはそのフラグメントを用いたA $\beta$ の検出試薬。
- [0043] 30) 上記1)から21)のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、または上記22)に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または上記23)に記載の修飾抗体またはそのフラグメントを用いたアルツハイマー痴呆症の診断薬。
- [0044] 31) 上記1)から21)のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、または上記22)に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または上記23)に記載の修飾抗体またはそのフラグメントを用いたA $\beta$ 凝集阻害剤。
- [0045] 32) 上記1)から21)のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、または上記22)に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または上記23)に記載の修飾抗体またはそのフラグメントを用いたアルツハイマー痴呆症の予防、治療剤。
- [0046] これらの抗A $\beta$ 抗体および抗体フラグメントはscFvやVLという小さな分子形態であるに関わらず、in vitroでA $\beta$ の凝集を抑制する効果があることが確認された。この抗体は分子量がきわめて小さいので脳血管関門を通過できるように抗体エンジニアリングすることができる。例えば、トランスフェリン受容体を介して脳血管関門を通過できるようにするトランスフェリンとの融合体や二重特異性抗体などもこの範疇に入る。
- [0047] また、P糖蛋白に対する抗体や脳血管関門の薬剤輸送に関わる受容体と相互作用し得るタンパク質や低分子との融合体とすることも可能である。また、さらに McCaffertyら(J. McCaffertyら、Nature, 348:552-554,1990)が報告したように、膜透過性に優れ、抗原性の少ない繊維状ファージの上にこれらの抗体フラグメントを提示させ、脳内に移行させることも可能である。
- [0048] さらに、これらの分子にFc受容体との相互作用領域を付加し、脳内でのミクログリア

との相互作用により、蓄積したA $\beta$ 凝集体の除去に用いることも可能である。

- [0049] 本発明による抗体は完全ヒト抗体であるので、診断の画像化を可能にするとともに、A $\beta$ 分子の凝集プロセスを阻害する治療法の開発ができる。従って、アルツハイマー痴呆症の医療への本発明の貢献は多大である。

#### 発明の効果

- [0050] 本発明のヒトモノクローナル抗体および該抗体フラグメント分子は、ヒト由来抗A $\beta$ 抗体の可変領域を有し、A $\beta$ と強く反応して、その凝集の阻害作用を示す。このことから本発明の抗体および該抗体フラグメントはアルツハイマー痴呆症の予防または治療薬として使用することができる。

#### 図面の簡単な説明

- [0051] [図1]分離クローンのscFvのA $\beta$  42ペプチドへの特異性を評価したELISAの結果を示す図。
- [0052] [図2]分離クローンのscFvの可溶性及び繊維化されたA $\beta$  42ペプチドへの特異性を評価したELISAの結果を示す図。
- [0053] [図3]発現scFv-His6およびVL-D1-D2-Hisの発現を抗His6抗体を用いてウエスタンブロットで確認した図。
- [0054] [図4]VL-D1-D2-HisのA $\beta$  42ペプチドへの特異性を評価したELISAの結果を示す図。
- [0055] [図5]精製scFvのA $\beta$  42ペプチド繊維化抑制活性を蛍光チオフラビン試験で評価した結果を示す図。
- [0056] [図6]精製scFv(Fv1E4)のA $\beta$  42ペプチド凝集阻害能の濃度依存性を示す図。
- [0057] [図7]精製scFv(B7)のA $\beta$  42ペプチド凝集阻害能の濃度依存性を示す図。
- [0058] [図8]繊維化したA $\beta$  42ペプチドに対するscFv提示ファージの結合性を示す図。
- [0059] [図9]繊維化したA $\beta$  42ペプチドに対するscFvの結合性を示す図。
- [0060] [図10]精製scFvのA $\beta$  42ペプチド繊維化抑制活性を蛍光チオフラビン試験で評価した結果を示す図。
- [0061] [図11]精製scFvのA $\beta$  42ペプチド凝集阻害能の濃度依存性を示す図。
- [0062] [図12]A $\beta$  42ペプチドに対する精製tatペプチド融合VL鎖の結合性を示す図。

[0063] [図13]精製tatペプチド融合VL鎖のA $\beta$  42ペプチド凝集阻害能の濃度依存性を示す図。

### 発明を実施するための最良の形態

[0064] 本発明の抗体および抗体フラグメントに使用されるscFv等は以下のようにして得られた。

[0065] 健常者20名分の末梢血Bリンパ球より、RT-PCR法にて、免疫グロブリン重(H)鎖、軽(L)鎖cDNAを増幅、更に両者をlinker DNAで結合し、健常者リンパ球由来のH鎖可変領域(VH鎖またはVH)とVL鎖のランダムな組み合わせによるscFv DNAを作製した。

[0066] このscFv DNAをファージミドベクターpCANTAB5Eに組込み、 $10^9$ クローンからなる健常者由来scFvディスプレイファージライブラリーを作製した。このライブラリーを、固相に固定化されたA $\beta$ と結合させて回収、濃縮し、抗A $\beta$  scFvディスプレイファージクローンをスクリーニングした。その結果、スクリーニングされた各クローンは、A $\beta$ と結合するscFv抗体もしくはVLフラグメントを産生した。

[0067] scFvやVLフラグメントの発現方法としては、例えば、大腸菌で発現させることができる。大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列等、発現させるscFvを機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーター等を挙げることができる。scFvの分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに発現させる場合、pelBシグナル配列(Lei, SP.ら, J. Bacteriol., 1987, 169 : 4379-4383)を用いるとよい。培養上清中に分泌させるにはM13ファージのg3蛋白のシグナル配列を用いることもできる。

[0068] またVLフラグメントの場合は、同様に単独で或いは他のペプチドやタンパク質との融合蛋白の形で発現させることができる。

[0069] 前記のように発現されたscFvは細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で発現されるscFvは、そのC末端にE tag配列が付加されているので、抗E tag抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて、容易に短時間で精製することができる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法

を組み合わせることも可能である。例えば、限外濾過、塩析、ゲル濾過／イオン交換／疎水クロマト等のカラムクロマトグラフィーを組み合わせれば抗体を分離・精製することができる。

- [0070] 本発明により得られたscFv蛋白やVL鎖は、A $\beta$ に対する結合活性を有することが明らかになった。本発明で使用される抗A $\beta$ 抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA、BIAcore等の方法がある。例えばELISAを用いる場合、A $\beta$ を固相化した96穴プレートに目的の抗A $\beta$ 抗体や抗体フラグメントを含む試料、例えば大腸菌の培養上清や精製抗体を加える。次にパーオキシダーゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、発色基質TMBZを加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。
- [0071] このようにして得られたscFvやVLフラグメントを用いて、A $\beta$ の凝集抑制が可能か評価した結果、A $\beta$ の凝集体の形成を十分に抑制することが可能であることが明らかになった。
- [0072] これは、本発明の抗A $\beta$ 抗体フラグメントが、正常型A $\beta$ に結合し、凝集型への構造変換を抑制したためと考えられる。このような効果は生体内で、これらの抗体および抗体フラグメントが、凝集型に構造変換することを十分に抑制可能であることを示している。従って、これらの低分子化抗体はA $\beta$ の構造変換を抑制する予防薬として、さらには症状の進展を抑制する薬剤としても十分に効果が期待できる。更に、本発明の抗A $\beta$ 抗体フラグメントは正常型A $\beta$ よりも、凝集型に強く反応する性質を有する配列を含んでいることが明らかになった。脳内に沈着したアミロイドは大部分が凝集型、あるいはそれらが繊維化したものと考えられており、先駆的なワクチン療法の試みで認められた患者脳内の脳アミロイド沈着の減少は、局所で活性化したミクログリア細胞がFc受容体を介して抗体-沈着したA $\beta$ 抗原複合体を取り込み、分解する作用の結果と推定されている。従って、本発明の抗A $\beta$ 抗体フラグメント(Fv1E1、Fv1E4、Fv1E7、Fv2A7、Fv2A8、Fv2B6、B7、B6、F10、D1、およびVLA2)およびこれらの抗体可変領域にFc領域を結合させた抗体分子や融合蛋白は、
- (1) 正常型A $\beta$ のみに結合し、凝集型への構造変換を抑制するもの(VLA2)；
  - (2) 凝集型および繊維化したA $\beta$ のみに結合し、凝集型A $\beta$ の除去、繊維化したA

$\beta$  の増加抑制、さらには正常型A  $\beta$  の凝集型への変換抑制に効果を発揮するもの(B6、F10、D1);または

(3) (1) 及び(2)の両特性を有するもの(Fv1E1、Fv1E4、Fv1E7、Fv2A7、Fv2A8、Fv2B6、B7)

であり、いずれもアルツハイマー型治療薬として有望である。

[0073] 上記阻害活性を有する10種類のscFv(Fv1E1、Fv1E4、Fv1E7、Fv2A7、Fv2A8、Fv2B6、B7、B6、F10、D1)のVH鎖およびVL鎖、並びにVL鎖(VLA2)のアミノ酸配列およびそれをコードする塩基配列は、下記の通りである。

[0074] (1)クローンFv1E1

クローンFv1E1のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号1に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号2～4に示した。すなわち、配列番号1に示すVH鎖のアミノ酸配列において、30番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号2)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号3)、99番目～107番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号4)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号5に示した。

[0075] また、クローンFv1E1のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号6に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号7～9に示した。すなわち、配列番号6に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号7)、51番目～57番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号8)、90番目～100番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号9)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号10に示した。

[0076] (2)クローンFv1E4

クローンFv1E4のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号11に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号12～14に示した。すなわち、配列番号11に示すVH鎖のアミノ酸配列において、30番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号12)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号13)、99番目～112番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号14)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号15に示した。

[0077] また、クローンFv1E4のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号16に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号17～19に示した。すなわち、配列番号16に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～36番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号17)、52番目～58番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号18)、91番目～100番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号19)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号20に示した。

[0078] (3)クローンFv1E7

クローンFv1E7のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号21に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号22～24に示した。すなわち、配列番号21に示すVH鎖のアミノ酸配列において、30番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号22)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号23)、99番目～111番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号24)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号25に示した。

[0079] また、クローンFv1E7のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号26に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号27～29に示した。すなわち、配列番号26に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～33番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号27)、49番目～55番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号28)、88番目～99番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号29)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号30に示した。

[0080] (4)クローンFv2A7

クローンFv2A7のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号31に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号32～34に示した。すなわち、配列番号31に示すVH鎖のアミノ酸配列において、30番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号32)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号33)、99番目～112番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号34)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号35に示した。

[0081] また、クローンFv2A7のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号36に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号37～39に示した。すなわち、配列番号36に

示すVL鎖のアミノ酸配列において、24番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号37)、51番目～57番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号38)、90番目～98番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号39)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号40に示した。

[0082] (5)クローンFv2A8

クローンFv2A8のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号41に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号42～44に示した。すなわち、配列番号41に示すVH鎖のアミノ酸配列において、30番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号42)、50番目～68番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号43)、101番目～112番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号44)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号45に示した。

[0083] また、クローンFv2A8のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号46に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号47～49に示した。すなわち、配列番号46に示すVL鎖のアミノ酸配列において、20番目～32番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号47)、48番目～54番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号48)、87番目～97番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号49)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号50に示した。

[0084] (6)クローンFv2B6

クローンFv2B6のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号51に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号52～54に示した。すなわち、配列番号51に示すVH鎖のアミノ酸配列において、30番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号52)、49番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号53)、98番目～110番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号54)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号55に示した。

[0085] また、クローンFv2B6のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号56に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号57～59に示した。すなわち、配列番号56に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～36番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号57)、52番目～58番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号58)、91番目～9

9番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号59)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号60に示した。

[0086] (7)クローンB7

クローンB7のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号61に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号62～64に示した。すなわち、配列番号61に示すVH鎖のアミノ酸配列において、31番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号62)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号63)、99番目～112番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号64)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号65に示した。

[0087] また、クローンB7のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号66に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号67～69に示した。すなわち、配列番号66に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～33番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号67)、49番目～55番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号68)、88番目～98番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号69)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号70に示した。

[0088] (8)クローンB6

クローンB6のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号71に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号72～74に示した。すなわち、配列番号71に示すVH鎖のアミノ酸配列において、31番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号72)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号73)、99番目～112番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号74)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号75に示した。

[0089] また、クローンB6のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号76に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号77～79に示した。すなわち、配列番号76に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～33番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号77)、49番目～55番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号78)、88番目～98番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号79)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号80に示した。



## [0090] (9)クローンF10

クローンF10のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号81に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号82～84に示した。すなわち、配列番号81に示すVH鎖のアミノ酸配列において、31番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号82)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号83)、99番目～114番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号84)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号85に示した。

[0091] また、クローンF10のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号86に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号87～89に示した。すなわち、配列番号86に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～33番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号87)、49番目～55番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号88)、88番目～98番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号89)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号90に示した。

## [0092] (10)クローンD1

クローンD1のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号91に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号92～94に示した。すなわち、配列番号91に示すVH鎖のアミノ酸配列において、31番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号92)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号93)、99番目～106番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号94)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号95に示した。

[0093] また、クローンD1のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号96に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号97～99に示した。すなわち、配列番号96に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～33番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号97)、49番目～55番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号98)、88番目～98番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号99)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号100に示した。

## [0094] (11)クローンVLA2

VL鎖のみからなるクローンVLA2のアミノ酸配列を配列番号101に示した。当該V

L鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号102～104に示した。すなわち、配列番号101に示すVL鎖のアミノ酸配列において、24番目～40番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号102)、56番目～62番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号103)、95番目～103番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号104)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号105に示した。

- [0095] 本発明により得られたクローン毎にアミノ酸配列および塩基配列について上述したが、配列表に記載された各アミノ酸配列情報(VH鎖、VL鎖、各CDR1～3)をもとに、単独または複数の配列を適宜組み合わせて使用することも可能である。
- [0096] 本発明の抗体およびその抗体フラグメントは、上記VH鎖およびVL鎖、並びにそれらのCDRとして、上記配列番号に示される配列に限定されるものではなく、それらの一部が改変された変異ポリペプチドであってもよい。
- [0097] すなわち、各配列番号に記載されたアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつアロイドβペプチドに対するH鎖またはL鎖の相補性決定領域、H鎖またはL鎖の可変領域となるポリペプチドも含まれる。
- [0098] ここで、「1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加された」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異タンパク質作製法により置換、欠失、挿入、および／または付加できる程度の数、例えば、1ないし6程度の数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されることを意味する。このような「変異」としては、主として、公知の変異タンパク質作製法により人為的に導入された変異を意味するが、天然(例えば、ヒト)に存在する同様の変異ポリペプチドを単離精製したものであってもよい。
- [0099] なお、上記「変異」は、本発明の抗体またはその抗体フラグメントを、治療薬として利用する場合(ヒトに投与する場合)には、ヒト由来の構造を保持またはヒトが免疫反応を起こさない範囲で行い、検出器具や診断キットなどとして使用する場合(ヒトに投与しない場合)には、その範囲は特に制限されない。
- [0100] 本発明で開示されるVH鎖および／またはVL鎖は、ファージ抗体法を用いて主としてscFvの形で得られたものであるが、原則としてその適用はscFvに限定されること

はない。例えば、開示したVH鎖および／またはVL鎖をヒト免疫グロブリンの定常領域と連結した完全分子型、またヒト免疫グロブリンの定常領域の一部と組み合わせたFab、Fab'またはF(ab')<sub>2</sub>、さらにscFvをヒト免疫グロブリンのH鎖またはL鎖の定常領域の一部のドメインと結合させた一本鎖抗体(scAb)や、scFvをヒト免疫グロブリンのH鎖およびL鎖の全定常領域と結合させたscFvFcなどの他の抗体フラグメントもその適用範囲に含まれる。

- [0101] また、本発明の抗体またはそのフラグメントは、当該抗体またはフラグメントにペプチド或いは他のタンパク質と融合させた融合抗体またはそのフラグメントとすることもできる。
- [0102] また、これらの抗体および抗体フラグメントあるいは上記融合抗体またはそのフラグメントに、ポリエチレングリコールなどの高分子修飾剤を結合させた修飾抗体またはそのフラグメントとすることもできる。
- [0103] H鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたscFvを調製する場合、ペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸10～25残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。
- [0104] 上記の抗体またはそのフラグメント、上記の融合抗体もしくはそのフラグメント、または上記の修飾抗体もしくはそのフラグメントは、A $\beta$ の検出試薬、A $\beta$ 凝集阻害剤、A $\beta$ が関与するアルツハイマー痴呆症の予防、治療剤、または診断薬として利用できる。
- [0105] 本発明の抗体または抗体フラグメントは、配列番号5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、または105に示した本発明により得られた各クローンのVH鎖およびVL鎖をコードする遺伝子配列情報をもとに、適当な宿主(例えば、細菌、酵母)に導入して、本発明の抗体またはそのフラグメントを発現させることができる。
- [0106] また本発明の遺伝子は、A $\beta$ が関与するアルツハイマー痴呆症の遺伝子治療薬としても利用できる。
- [0107] 以下、本発明を実施例に基づき詳細に説明するが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

## 実施例

### [0108] 《実施例1:健常者からのファージライブラリーの構築》

ファージライブラリーの構築は、J. D. Marks ら (J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991) により報告されている方法を参考に、健常者20名由来末梢血由来リンパ球を出発材料に、構築した。構築したVH( $\gamma$ )-V $\kappa$ 、VH( $\gamma$ )-V $\lambda$ 、VH( $\mu$ )-V $\kappa$ 、VH( $\mu$ )-V $\lambda$ の各サブライブラリーはそれぞれ $1.1 \times 10^8$ 、 $2.1 \times 10^8$ 、 $8.4 \times 10^7$ 、 $5.3 \times 10^7$ クローンの多様性を有すると評価された。

### [0109] 《実施例2:パンニング》

125  $\mu$ g/mlのDSS 100  $\mu$ Lで活性化したCova-link plate (Nunc)に0.1M炭酸バッファ pH9.6に溶解した1  $\mu$ g A $\beta$  42ペプチドを加え、4°Cで一晩静置した。

[0110] 0.1%Tween20を含むPBSで1回洗浄後、1回目の選択用には0.5%のゼラチンで2回目の選択用には0.25%のBSAでプレートをブロック処理した。

[0111] これに健常人由来の抗体ファージライブラリー(一本鎖抗体提示ファージ液)をVH( $\gamma$ )-V $\kappa$ とVH( $\gamma$ )-V $\lambda$ の混合物、VH( $\mu$ )-V $\kappa$ とVH( $\mu$ )-V $\lambda$ の混合物の2種の場合に分けて、100  $\mu$ L ( $5 \times 10^{11}$  tu/mL) ずつ加え、室温で1時間反応させた。

[0112] 0.1%Tween20-PBSで10回洗浄した後、100  $\mu$ Lのグリシン緩衝液(pH2.2)を加え、IL-18と結合する一本鎖抗体提示ファージを溶出させた。溶出したファージは1M Tris (hydroxymethyl)aminomethane-HCl, pH9.1を加えてpHを調整した後、対数増殖期の大腸菌TG1に感染させた。感染後のTG1は3000 $\times$ g,10分で遠心分離して、上清を除き、200  $\mu$ Lの2 $\times$ YT培地で懸濁し、SOBAGプレート(2%グルコース、100  $\mu$ g/mlのアンピシリン含有SOBプレート)に播き、30°Cのふ卵器中で一晩培養した。生じたコロニーは適量の2 $\times$ YT培地を加えスクレイパー(Costar)を使って懸濁、回収した。

[0113] このTG1液50  $\mu$ Lを、30mLの2 $\times$ YTAG培地に植え、ヘルパーファージを用いてレズキューし、スクリーニング後のファージライブラリーを調製した。健常人由来ファージライブラリーVH( $\gamma$ )-V $\kappa$ とVH( $\gamma$ )-V $\lambda$ 由来、VH( $\mu$ )-V $\kappa$ とVH( $\mu$ )-V $\lambda$ 由来、それぞれについて前述のA $\beta$  42ペプチド固定化プレートを用いてパンニングを計2回行った。2回目のパンニング後に、SOBAGプレートから任意にクローンを抽出

し、scFvの発現の確認およびA $\beta$  42ペプチドELISAによる特異性の確認と塩基配列の解析を行った。

[0114] 《実施例3:スクリーニングA $\beta$  42ペプチドELISA》

分離したクローンのスクリーニングのためのELISAは以下のように行った。A $\beta$  42ペプチドをELISAプレートに固定化してスクリーニングに用いた。1.25  $\mu$ g/mLのA $\beta$  42ペプチド、2.5  $\mu$ g/mLのヒト血清アルブミン(HSA)を40  $\mu$ L/well ELISAプレート(Nunc)に入れ、4°Cで16時間静置し、固定化した。固定化プレートは、0.5%BSA、0.5%ゼラチンおよび5%スキムミルクを含むPBS溶液400  $\mu$ L/wellをELISAプレートに入れ、4°Cで2時間静置し、ブロッキングを行った。

[0115] scFv提示ファージを含む試料液を40  $\mu$ L/well入れて反応させた後、試料液を捨て洗浄液で5回洗った。ビオチン標識した抗M13モノクローナル抗体(Pharmacia biotech)と反応させ、アルカリフォスファターゼ(AP)標識した抗マウスIgG抗体と反応させた。洗浄液で5回洗った後、発色基質液(1g/mL p-nitrophenyl phosphate(Wako)、10%ジエタノールアミン(Wako)を含むPBS溶液)を50  $\mu$ L/well入れ、遮光し、室温～37°Cで、5～10分発色させた。マルチプレートオートリーダーNJ-2001(Inter Med)で405nmの吸光度を測定した結果、評価したクローン全てが、A $\beta$  42ペプチドに特異的であることが確認できた。

[0116] 《実施例4:クローンの配列分析》

単離したクローンのscFv遺伝子のVHおよびVLのDNA塩基配列をDye terminator cycle sequencing FS Ready Reaction kit (Applied Biosystems)を用いて決定した。ELISAおよび配列分析の結果、単離したクローンは6種のscFvと1種のVLに分類された。

[0117] 《実施例5:ヒト由来抗A $\beta$  42ペプチドscFvの発現と精製》

前記実施例2、3で単離したA $\beta$  42ペプチドに反応するscFvクローンからプラスミドDNAを回収して、常法に従って大腸菌HB1251を形質転換した。2%グルコースおよび100  $\mu$ g/mLのアンピシリンを含む2 $\times$ YT培地でこれらの大腸菌を一夜前培養後、グルコースフリーの2 $\times$ YT培地に一部移植し、終濃度1mM IPTG、100  $\mu$ g/mLのアンピシリンを加えて更に一夜培養してscFvの発現誘導を行った。培養終了後菌体を

遠心回収し、1mM EDTAを含むPBSに懸濁して氷中に30分菌体を放置した。次いで8,900×gで30分間遠心し、上清を回収して0.45 μmフィルター濾過後、ペリプラズム画分からのscFvの精製出発材料とした。

[0118] このようにして調製した精製の出発材料を、抗E tag抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで常法に従って精製した。PBSで透析後、エンドトキシン除去カラム Detoxi-gel (PIERCE社) で添付のプロトコルに従いエンドトキシンを除去した。分子量カット10,000のCentricon (Amicon社) で濃縮後、0.45 μmフィルター濾過して精製標品とした。

[0119] 《実施例6: 精製scFvのA β 42ペプチドとの結合性》

次に精製scFvのA β 42ペプチドとの結合性をELISA法で測定した。PBSで1.25 μg/mLに調整したA β 42ペプチドを固相化した96穴プレート(NUNC. MAXISORP)に、精製抗体を100 μL加えて37°Cで1時間反応させた。0.05% Tween-PBS (以下PBSTと省略することもある) で5回洗浄後、抗E tag抗体と37°C1時間反応させた。さらに、PBSTで5回洗浄後、アルカリフォスファターゼ (AP) 標識した抗マウスIgG抗体と37°C1時間反応させた。PBSTで5回洗浄後、発色基質液を加えて呈色させ、405nmの吸光度を測定して結合性を評価した。結果を図1に示す。十分な発現を示し、評価できた5種のscFvは全てA β 42ペプチドと特異的に結合した。また、データには示していないが、その他のscFvとしてB7もA β 42ペプチドと特異的に結合した。

[0120] 《実施例7: 精製scFvの特異性解析》

scFvの繊維化したA β 42ペプチドとの結合性をELISA法で測定した。PBSで1.25 μg/mLに調製した繊維化したA β 42ペプチド、可溶性A β 42ペプチド、5 μg/mLマウスIgG及び0.5%ゼラチンのみを固相化した96穴プレート(NUNC. MAXISORP)に、大腸菌ペリプラズム画分から精製したscFvを100 μL加えて37°Cで1時間反応させた。0.05% Tween-PBS (以下PBSTと省略することもある) で5回洗浄後、ビオチン化抗E tag抗体と37°C1時間反応させた。さらに、PBSTで5回洗浄後、アルカリフォスファターゼ (AP) 標識したストレプトアビジンと37°C30分反応させた。PBSTで5回洗浄後、発色基質液を加えて呈色させ、405nmの吸光度を測定して結合性を評価した。結果を図2に示す。評価した6種のscFvは全て可溶性のA β 42ペプチドと同様に繊維化

したA $\beta$  42ペプチドとも強く結合することが明らかになった。

[0121] 《実施例8:ヒト由来抗A $\beta$  42ペプチドVL鎖の発現と精製》

前記実施例2および3で単離したA $\beta$  42ペプチドに反応するクローンの内、1クローンはJH鎖の一部とVL鎖のみから構成されていた。このクローンのDNAのうちVK鎖の部分のみをPCR法でリクローニングして、5'末端に制限酵素SfiIの認識サイトを、さらに3'末端に制限酵素NotIの認識サイトを付加した。両制限酵素で切断、アガロースゲル電気泳動で精製後、このクローンのVL鎖をpTrc99A-D1+D2-His (繊維状ファージのg3タンパクのD1およびD2ドメインの末端にHis<sub>6</sub>がついたタンパク質と融合タンパク質の形で発現できるようにした発現ベクター)に組み込み、大腸菌JM83を形質転換した。この形質転換体を実施例5と同様に培養し、大腸菌ペリプラズム画分よりVL-D1-D2-His<sub>6</sub>タンパク質を回収した。ウエスタンブロットで解析した結果、設計通りの47Kdaのバンドを示す融合タンパクの発現が確認できた(図3)。

[0122] 《実施例9:VL鎖のA $\beta$  42ペプチドとの結合性》

実施例8で回収したVL鎖40 $\mu$ l/ウエルをELISAプレートに添加し、室温で6時間静置した。0.1% Tween20を含むPBSで1回洗浄後、0.25%のBSAでプレートをブロック処理した。処理後のプレートに100ng/ウエルのA $\beta$  42ペプチド、MCP-1、IL-5、ヒトプリオン或いはウシプリオン(PrPc102-241 InPro BioTech)を加え、37°Cで1時間反応させた。PBSTで5回洗浄後、それぞれの抗原に対応した二次抗体(抗A $\beta$  42モノクローナル抗体、抗MCP-1モノクローナル抗体、抗IL-5モノクローナル抗体、抗プリオンモノクローナル抗体)をさらに反応させた。PBSTで5回洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス抗体と更に37°C 1時間反応させた。PBSTで5回洗浄後、発色基質液を加えて呈色させ、405nmの吸光度を測定して結合性を評価した。結果を図4に示す。評価したVLはA $\beta$  42ペプチドと特異的に結合した。

[0123] 《実施例10:精製scFvのA $\beta$  42ペプチド凝集阻害能の評価》

実施例5で調製した精製scFvを用いて、A $\beta$  42ペプチドの凝集阻害能の評価を行った。凝集阻害能の評価はアミロイド繊維形成の進展を蛍光チオフラビン試験で行った。サンプル220nMを10 $\mu$ Mのチオフラビンを含む0.1Mリン酸カリウムバッファー、pH6.5で4nMに希釈し、室温で2分間攪拌した。このときに1%wt/wtの種の凝集体(

予め巨大分子生成を抑制するため、超音波処理したもの)を同時に添加した。チオフラビン色素の励起光450nmでの蛍光482nmを測定し(日立、F-3000)、凝集の生成を評価した。その結果、評価した4クローン全てで凝集抑制活性が確認できた(図5)

[0124] 《実施例11:精製scFvのA $\beta$  42ペプチド凝集阻害能の濃度依存性評価》

実施例5で調製した精製scFvを用いて、A $\beta$  42ペプチドの凝集阻害能の濃度依存性の評価を行った。凝集阻害能の評価は実施例10と同様にアミロイド繊維形成の進展を蛍光チオフラビン試験で行った。20  $\mu$  MのA $\beta$  42にコントロールscFvおよび精製scFv(Fv1E4およびB7、0~40  $\mu$  g/ml)を加えて、24時間37°Cで静置した。A $\beta$  42の濃度が2  $\mu$  Mになるように調整後、10  $\mu$  MになるようにチオフラビンTを加え、室温で2分間攪拌した。チオフラビン色素の励起光450nmでの蛍光482nmを測定し(日立、F-3000)、凝集の生成を評価した。その結果、評価した2クローンはscFv濃度依存的に凝集抑制活性を有することが確認できた(図6および図7)。

[0125] 《実施例12:繊維化したA $\beta$  42ペプチドに対するscFv提示ファージの結合性》

繊維化したA $\beta$  42ペプチドに対するscFv提示ファージの結合性をELISA法で測定した。PBSで50ng/mLに調整した繊維化したA $\beta$  42ペプチド、可溶性A $\beta$  42ペプチド、1000倍希釈したA $\beta$  血清を40  $\mu$  L/wellずつELISAプレート(Nunc)に入れ、4°Cで6時間静置し、固定化した。固定化プレートは、0.25%BSAを含むPBS溶液を400  $\mu$  L/wellずつELISAプレートに入れ、4°Cで一晩静置し、ブロッキングを行った。

[0126] scFv提示ファージを含む試料液40  $\mu$  L/wellを入れて反応させた後、試料液を捨て洗浄液で5回洗った。ビオチン標識した抗M13モノクローナル抗体(Pharmacia biotech)と反応させ、アルカリフォスファターゼ(AP)標識した抗マウスIgG抗体と反応させた。洗浄液で5回洗った後、発色基質液(1g/mL p-nitrophenyl phosphate(Wako)、10%ジエタノールアミン(Wako)を含むPBS溶液)を50  $\mu$  L/well入れ、遮光し、マルチプレートオートリーダーNJ-2001(Inter Med)で405nmの吸光度を測定した。その結果、評価したクローン全てが、繊維化したA $\beta$  42ペプチドに特異的であることが確認できた(図8)。

[0127] 《実施例13:繊維化したA $\beta$  42ペプチドに対するscFvの結合性》

繊維化したA $\beta$  42ペプチドに対するscFvの結合性をELISA法で測定した。実施



例5と同様に精製したscFvを3  $\mu$ g/mL含む試料液を40  $\mu$ L/wellずつ、実施例12と同様に調製したプレートに入れて反応させた後、試料液を捨て洗浄液で5回洗った。anti-Etag mAb (1:1000)と反応させ、アルカリフォスファターゼを結合させたgoat mouse IgG (1:1000)と反応させた。発色基質液以降は実施例12と同様に測定した。その結果、評価したB6とF10は、繊維化したA  $\beta$  42ペプチドに特異的であることが確認できた(図9)。

[0128] 《実施例14:精製scFvのA  $\beta$  42ペプチド凝集阻害能の評価》

実施例13で調製した精製scFvを用いて、A  $\beta$  42ペプチドの凝集阻害能の評価を行った。凝集阻害能の評価はアミロイド繊維形成の進展を蛍光チオフラビン試験で行った。サンプル20  $\mu$ Mに終濃度40  $\mu$ g/mlになるようにscFvを加えて放置した。各時間ごとにサンプルを回収し、A  $\beta$  の濃度を2  $\mu$ Mに調整後、10  $\mu$ MになるようにチオフラビンTを加え、室温で2分間静置した。チオフラビン色素の励起光450nmでの蛍光482nmを測定し(日立、F-3000)、凝集の生成を継続的に評価した。その結果、評価した3クローン全てで凝集抑制活性が確認できた(図10)

[0129] 《実施例15:精製scFvのA  $\beta$  42ペプチド凝集阻害能の濃度依存性評価》

実施例13で調製した精製scFvを用いて、A  $\beta$  42ペプチドの凝集阻害能の濃度依存性の評価を行った。凝集阻害能の評価は実施例14と同様にアミロイド繊維形成の進展を蛍光チオフラビン試験で行った。20  $\mu$ MのA  $\beta$  42にコントロールscFvおよび精製scFv(終濃度0~40  $\mu$ g/ml)を加えて、24時間37°Cで静置した。A  $\beta$  42の濃度が2  $\mu$ Mになるように調整後、10  $\mu$ MになるようにチオフラビンTを加え、室温で2分間攪拌した。チオフラビン色素の励起光450nmでの蛍光482nmを測定し(日立、F-3000)、凝集の生成を評価した。その結果、評価した3クローンはscFv濃度依存的に凝集抑制活性を有することが確認できた(図11)。

[0130] 《実施例16:tatペプチド融合ヒト由来抗A  $\beta$  42ペプチドVL鎖の発現調製》

実施例8で構築したA  $\beta$  42ペプチド特異的VL鎖遺伝子の5'末端にHIV tatペプチド配列(Met Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly)(配列番号106)をPCRを用いて付加し、制限酵素サイトNdeI, NotIを用いてpET-29b ベクター(Novagen社)に組み込んだ。大腸菌BL21 (DE3) starに形質転換後、IPTG誘導により

、tat-VL鎖をinclusion bodyとして発現させた。菌体を回収後、超音波破碎し、遠心分離後、上清を除去し、不溶性画分を6M塩酸グアニジンを用いて可溶化した。可溶化画分を、6M塩酸グアニジン存在下、Ni-NTAカラムにアプライし、洗浄後、カラムに結合した蛋白質をイミダゾールを用いて溶出し、tat-VL鎖精製画分とした。tat-VL鎖精製画分は段階透析法によるリフォールディングを以下の様に行った。50mM Tris-HCl(pH 8.0), 10mM  $\beta$ -ME, 1mM EDTA, 200mM NaCl, 6M GdnHCl溶液で7.5  $\mu$ M tat-VL鎖溶液になるように調整、 $\beta$ -MEを除いた前記の溶液で2時間透析した。更に、6M GdnHClで3時間、3M GdnHClで6時間、2M GdnHClで12時間、1M GdnHCl/375 $\mu$ M GSSG/200mM L-Arginineで12時間、0.5M GdnHCl/375 $\mu$ M GSSG/200mM L-Arginine で12時間、PBSで12時間透析を行い、最終的なリフォールディングしたtat-VL鎖を調製した。

[0131] 《実施例17: tatペプチド融合VL鎖のA $\beta$  42ペプチド結合能評価》

実施例16で回収したtatペプチド融合VL鎖40  $\mu$ l/ウェルをELISAプレートに添加し、4°Cで12時間静置した。0.1% tweenを含むPBSで1回洗浄後、0.5%ゼラチンでプレートをブロック処理した。処理後のプレートに100ng/ウェルのA $\beta$  42ペプチド、MCP-1、マウスIgG或いはヤギIgGを加え、37°Cで1時間反応させた。PBSTで5回洗浄後、それぞれの抗原に対応した二次抗体(抗A $\beta$  42モノクローナル抗体、抗MCP-1モノクローナル抗体、抗ヤギIgG抗体)をさらに反応させた(マウスIgG抗体は洗浄せずそのまま反応させた)。PBSTで5回洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス抗体と更に37°Cで1時間反応させた。PBSTで5回洗浄後、発色基質液を加えて呈色させ、405nmの吸光度を測定して結合性を評価した。結果を図12に示す。評価した精製tatペプチド融合VLはA $\beta$  42ペプチドと特異的に結合した。

[0132] 《実施例18: tatペプチド融合VL鎖のA $\beta$  42ペプチド凝集阻害能の濃度依存性評価》

実施例16で調製した精製tatペプチド融合VL鎖を用いて、A $\beta$  42ペプチドの凝集阻害能の評価を行った。凝集阻害能の評価はアミロイド繊維形成の進展を実施例10と同様の蛍光チオフラビン試験で行った。その結果、評価した精製tatペプチド融合VL鎖が凝集抑制活性を有することが確認できた(図13)。

## 請求の範囲

- [1] アミロイド  $\beta$  ペプチド(A $\beta$ )に結合性を有するヒト抗A $\beta$ 抗体。
- [2] H鎖の相補性決定領域(CDR)が以下の(a)または(b)のアミノ酸配列を有し、L鎖の相補性決定領域(CDR)が以下の(c)または(d)のアミノ酸配列を有する、請求項1に記載のヒト抗A $\beta$ 抗体：
- (a) CDR1として配列番号2、12、22、32、42、52、62、72、82または92のいずれか一つ、CDR2として配列番号3、13、23、33、43、53、63、73、83または93のいずれか一つ、およびCDR3として配列番号4、14、24、34、44、54、64、74、84または94のいずれか一つによりそれぞれ示されるアミノ酸配列；
- (b) CDR1～3のアミノ酸配列として、それぞれ、配列番号2～4、12～14、22～24、32～34、42～44、52～54、62～64、72～74、82～84、または92～94、またはこれらアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列であって、A $\beta$ に対するH鎖の相補性決定領域となりうるもの；
- (c) CDR1として配列番号7、17、27、37、47、57、67、77、87、97または102のいずれか一つ、CDR2として配列番号8、18、28、38、48、58、68、78、88、98または103のいずれか一つ、およびCDR3として配列番号9、19、29、39、49、59、69、79、89、99または104のいずれか一つによりそれぞれ示されるアミノ酸配列；
- (d) CDR1～3のアミノ酸配列として、それぞれ、配列番号7～9、17～19、27～29、37～39、47～49、57～59、67～69、77～79、87～89、97～99、または102～104、またはこれらアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列であって、A $\beta$ に対するL鎖の相補性決定領域となりうるもの。
- [3] H鎖のCDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号2～4、12～14、22～24、32～34、42～44、52～54、62～64、72～74、82～84、または92～94の組み合わせから選択されるアミノ酸配列であり、L鎖のCDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号7～9、17～19、27～29、37～39、47～49、57～59、67～69、77～79、87～89、97～99、または102～104の組み合わせから選択されるアミノ酸配列である、請求項

2に記載のヒト抗A $\beta$ 抗体。

- [4] H鎖のCDR1～3とL鎖のCDR1～3との組み合わせのアミノ酸配列が、配列番号2～4と配列番号7～9、配列番号12～14と配列番号17～19、配列番号22～24と配列番号27～29、配列番号32～34と配列番号37～39、配列番号42～44と配列番号47～49、配列番号52～54と配列番号57～59、配列番号62～64と配列番号67～69、配列番号72～74と配列番号77～79、配列番号82～84と配列番号87～89、または配列番号92～94と配列番号97～99とのいずれか一つの組み合わせである、請求項3に記載のヒト抗A $\beta$ 抗体。

- [5] H鎖可変領域が以下の(e)または(f)のアミノ酸配列を有し、L鎖可変領域が以下の(g)または(h)のアミノ酸配列を有する、請求項1から4のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体:

(e) 配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81または91のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列;

(f) 配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81または91に示されるアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、A $\beta$ に対するH鎖可変領域となりうるもの;

(g) 配列番号6、16、26、36、46、56、66、77、86、96または101のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列;

(h) 配列番号6、16、26、36、46、56、66、77、86、96または101に示されるアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、A $\beta$ に対するL鎖可変領域となりうるもの。

- [6] H鎖可変領域とL鎖可変領域との組み合わせのアミノ酸配列が、配列番号1と配列番号6、配列番号11と配列番号16、配列番号21と配列番号26、配列番号31と配列番号36、配列番号41と配列番号46、配列番号51と配列番号56、配列番号61と配列番号66、配列番号71と配列番号76、配列番号81と配列番号86、または配列番号91と配列番号96との組み合わせにより示されるアミノ酸配列である、請求項1から5のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体。

- [7] 当該A $\beta$ が繊維化したA $\beta$ である請求項1から6のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗

体。

- [8] アミロイド  $\beta$  ペプチド(A  $\beta$ )に結合性を有するヒト抗A  $\beta$  抗体のH鎖可変領域フラグメント。
- [9] 相補性決定領域(CDR)が以下の(a)または(b)のアミノ酸配列を有する、請求項8に記載のヒト抗A  $\beta$  抗体のH鎖可変領域フラグメント:  
(a) CDR1として配列番号2、12、22、32、42、52、62、72、82または92のいずれか一つ、CDR2として配列番号3、13、23、33、43、53、63、73、83または93のいずれか一つ、およびCDR3として配列番号4、14、24、34、44、54、64、74、84または94のいずれか一つによりそれぞれ示されるアミノ酸配列;  
(b) CDR1~3のアミノ酸配列として、それぞれ、配列番号2~4、12~14、22~24、32~34、42~44、52~54、62~64、72~74、82~84、または92~94、またはこれらアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、A  $\beta$  に対するH鎖の相補性決定領域となりうるもの。
- [10] CDR1~3のアミノ酸配列が、配列番号2~4、12~14、22~24、32~34、42~44、52~54、62~64、72~74、82~84、または92~94の組み合わせから選択されるアミノ酸配列である、請求項9に記載のヒト抗A  $\beta$  抗体のH鎖可変領域フラグメント。
- [11] 以下の(e)または(f)のアミノ酸配列を有する、請求項8から10のいずれかに記載のヒト抗A  $\beta$  抗体のH鎖可変領域フラグメント:  
(e) 配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81または91のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列;  
(f) 配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81または91に示されるアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、A  $\beta$  に対するH鎖可変領域となりうるもの。
- [12] 当該A  $\beta$  が繊維化したA  $\beta$  である請求項8から11のいずれかに記載のヒト抗A  $\beta$  抗体のH鎖可変領域フラグメント。
- [13] アミロイド  $\beta$  ペプチド(A  $\beta$ )に結合性を有するヒト抗A  $\beta$  抗体のL鎖可変領域フラグ

メント。

- [14] 相補性決定領域(CDR)が以下の(c)または(d)のアミノ酸配列を有する、請求項13に記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のL鎖可変領域フラグメント:

(c) CDR1として配列番号7、17、27、37、47、57、67、77、87、97または102のいずれか一つ、CDR2として配列番号8、18、28、38、48、58、68、78、88、98または103のいずれか一つ、およびCDR3として配列番号9、19、29、39、49、59、69、79、89、99または104のいずれか一つによりそれぞれ示されるアミノ酸配列;

(d) CDR1~3のアミノ酸配列として、それぞれ、配列番号7~9、17~19、27~29、37~39、47~49、57~59、67~69、77~79、87~89、97~99、または102~104、またはこれらアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、A $\beta$ に対するL鎖の相補性決定領域となりうるもの。

- [15] CDR1~3のアミノ酸配列が、配列番号7~9、17~19、27~29、37~39、47~49、57~59、67~69、77~79、87~89、97~99、または102~104の組み合わせから選択されるアミノ酸配列である、請求項14に記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のL鎖可変領域フラグメント。

- [16] 以下の(g)または(h)のアミノ酸配列を有する、請求項8から10のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のL鎖可変領域フラグメント:

(g) 配列番号6、16、26、36、46、56、66、77、86、96または101のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列;

(h) 配列番号6、16、26、36、46、56、66、77、86、96または101に示されるアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、A $\beta$ に対するL鎖可変領域となりうるもの。

- [17] 当該A $\beta$ が繊維化したA $\beta$ である請求項13から16のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のL鎖可変領域フラグメント。

- [18] 請求項8から12のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のH鎖可変領域フラグメントと、請求項13から17のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のL鎖可変領域フラグメントとを連結してなる、A $\beta$ に対するヒト由来の抗体の一本鎖可変領域フラグメント。

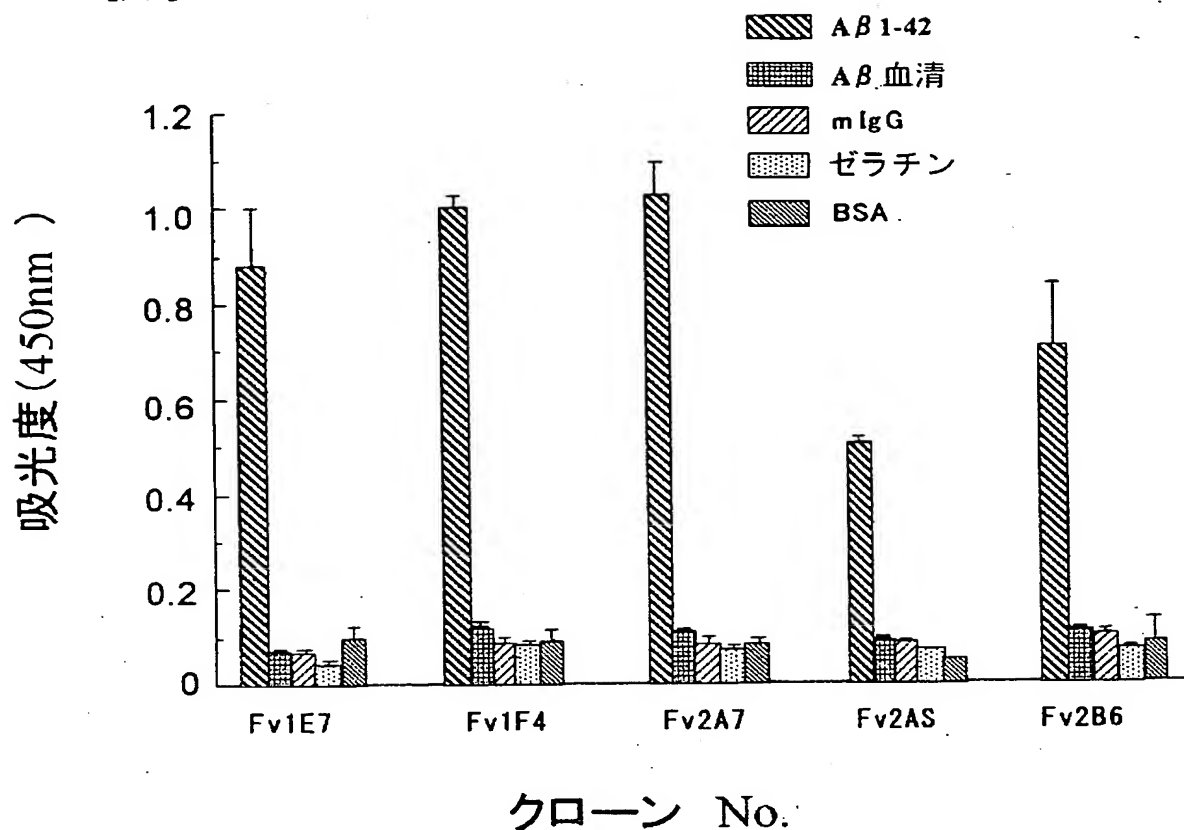
- [19] 請求項8から12のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のH鎖可変領域フラグメント、および／または請求項13から17のいずれかに記載のヒト抗A $\beta$ 抗体のL鎖可変領域フラグメントに、ヒト由来の抗体定常領域を連結してなる、A $\beta$ に対するヒト由来の抗体またはその抗体フラグメント。
- [20] 当該抗体フラグメントが、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scAb、またはscFv-Fcである請求項19に記載の抗体フラグメント。
- [21] 配列番号101のアミノ酸配列を有するヒト抗A $\beta$ 抗体のL鎖可変領域フラグメントとヒト由来の抗体定常領域を連結してなるA $\beta$ に対するヒト由来の抗体またはそのフラグメント。
- [22] 請求項1から21のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメントとペプチド或いは他のタンパク質とを融合させた融合抗体またはそのフラグメント。
- [23] 請求項1から22のいずれかに記載の抗体もしくは融合抗体またはそのフラグメントに修飾剤が結合されてなる修飾抗体またはそのフラグメント。
- [24] 請求項1から22のいずれかに記載の抗体もしくは融合抗体またはそのフラグメントをコードする遺伝子。
- [25] 請求項24に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。
- [26] 請求項24に記載の遺伝子が導入された形質転換体。
- [27] 請求項24に記載の遺伝子を宿主に発現させることによって、ヒト抗A $\beta$ 抗体またはその断片を生産する方法。
- [28] 請求項24に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。
- [29] 請求項1から21のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、または請求項22に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または請求項23に記載の修飾抗体またはそのフラグメントを用いたA $\beta$ の検出試薬。
- [30] 請求項1から21のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、または請求項22に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または請求項23に記載の修飾抗体またはそのフラグメントを用いたアルツハイマー痴呆症の診断薬。
- [31] 請求項1から21のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、または請求項22に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または請求項23に記載の修飾抗体また

はそのフラグメントを用いたA $\beta$ 凝集阻害剤。

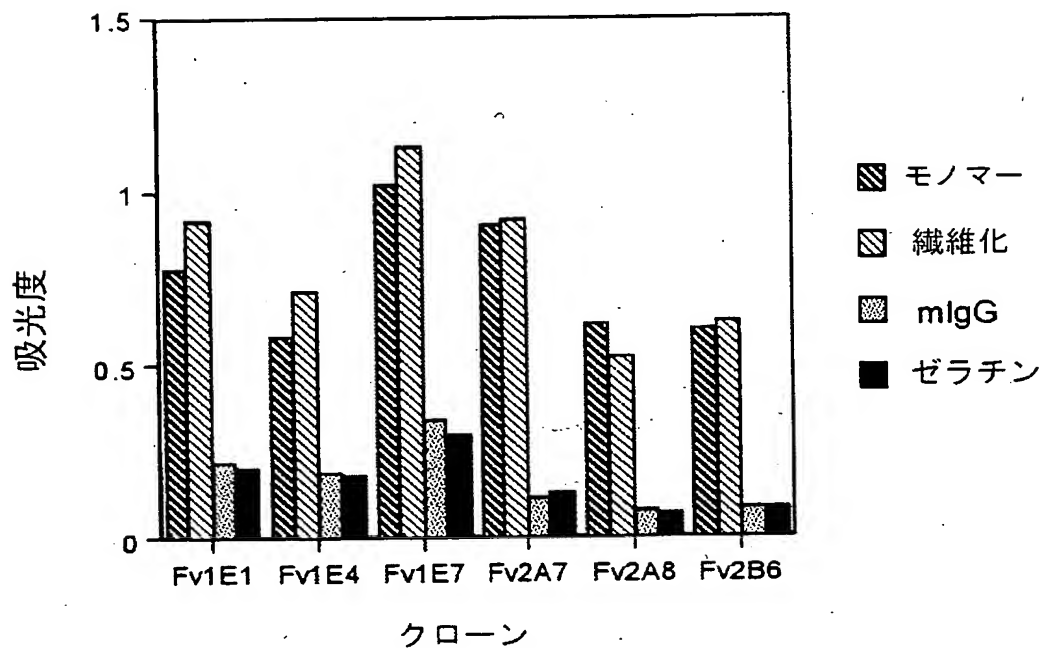
- [32] 請求項1から21のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、または請求項22に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または請求項23に記載の修飾抗体またはそのフラグメントを用いたアルツハイマー痴呆症の予防、治療剤。



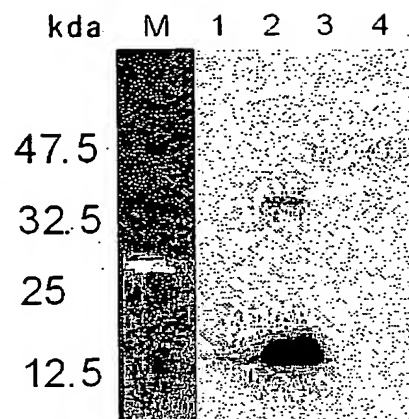
[図1]



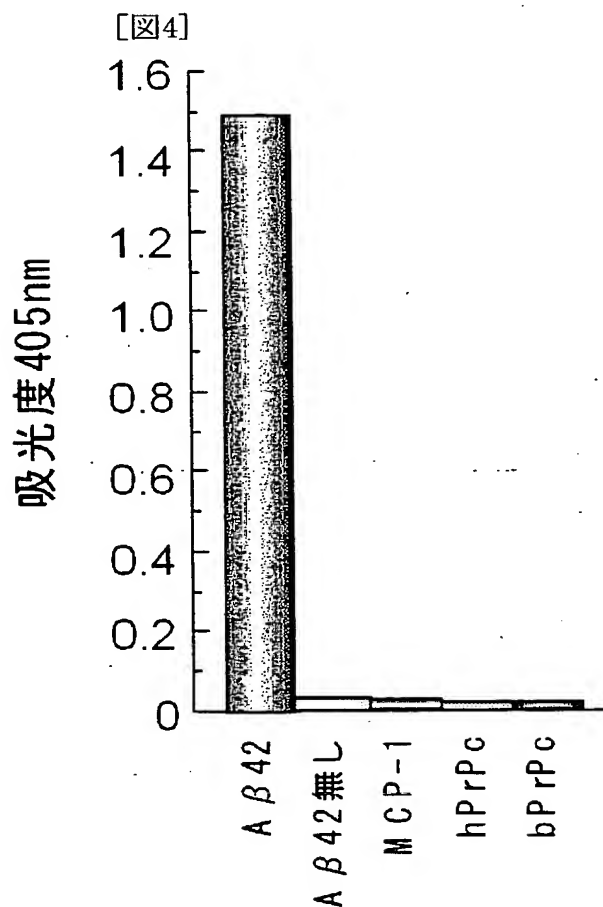
[図2]



[図3]

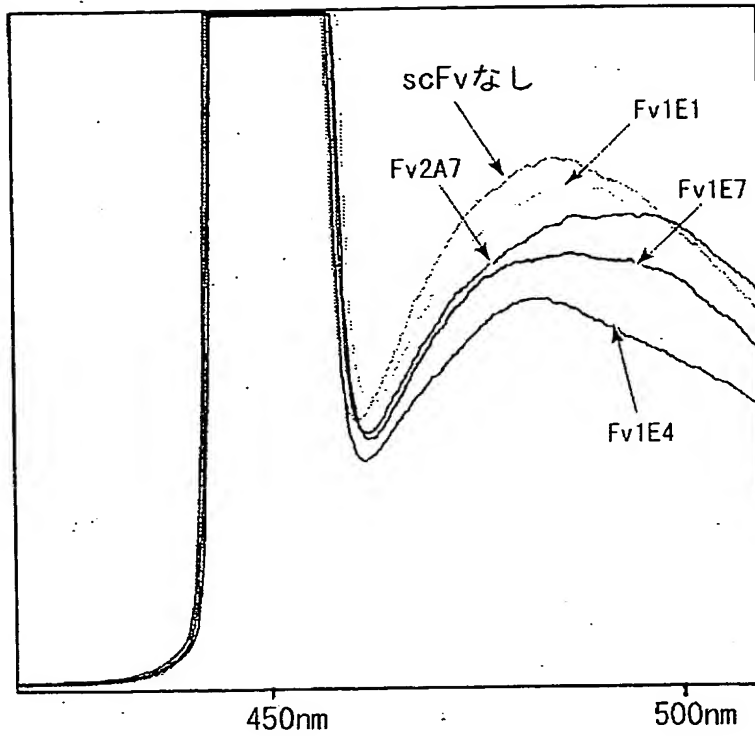


M: マーカ  
 lane1: 大腸菌発現VL ペリプラスム回収画分  
 lane2: 大腸菌発現VL細胞質画分  
 lane3及び4: 大腸菌発現VL-g3-D1-D2融合タンパク質  
 ペリプラスム回収画分

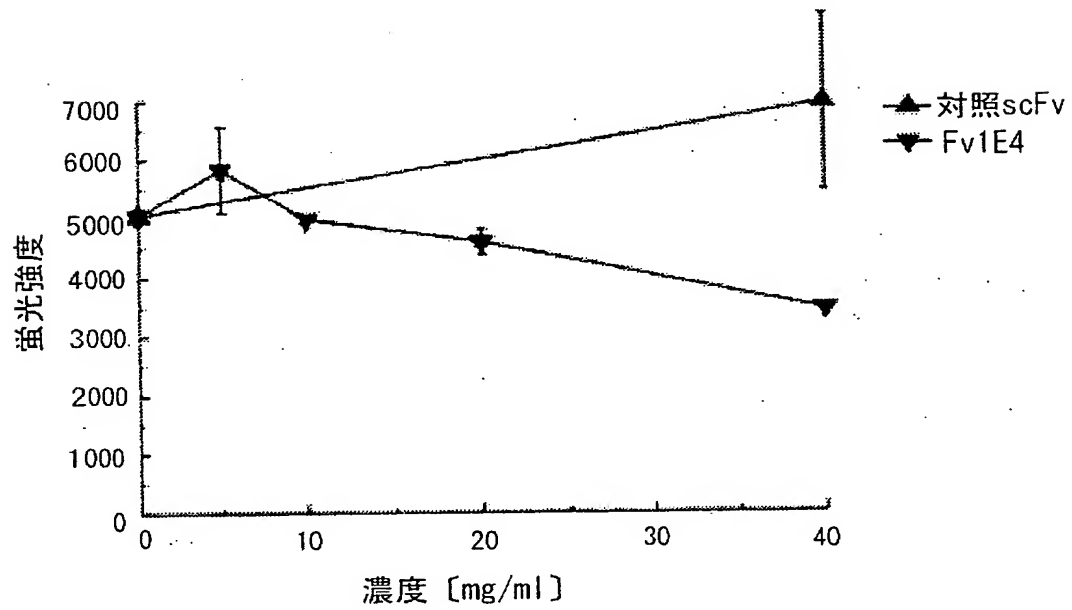


[図5]

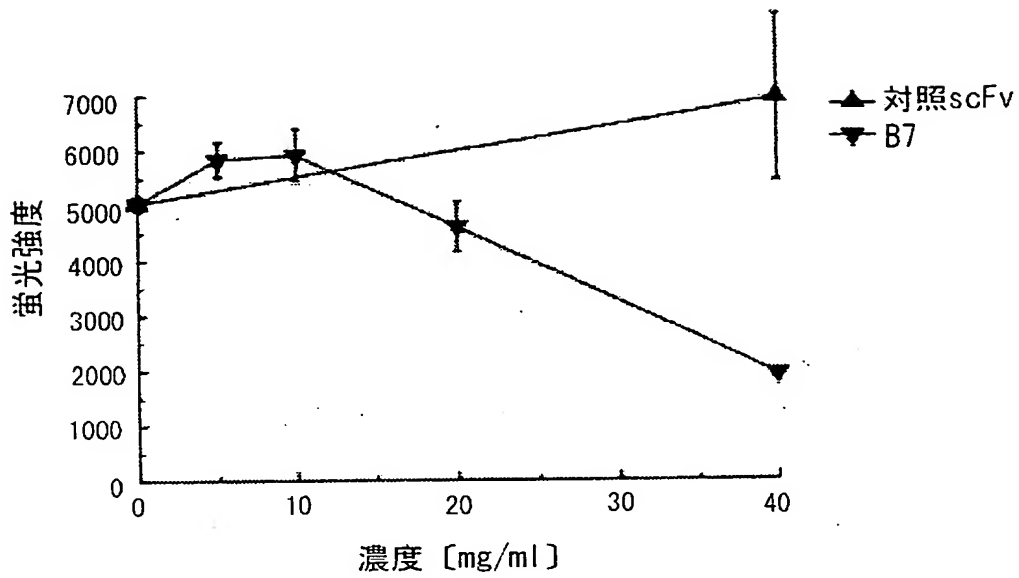
10.0



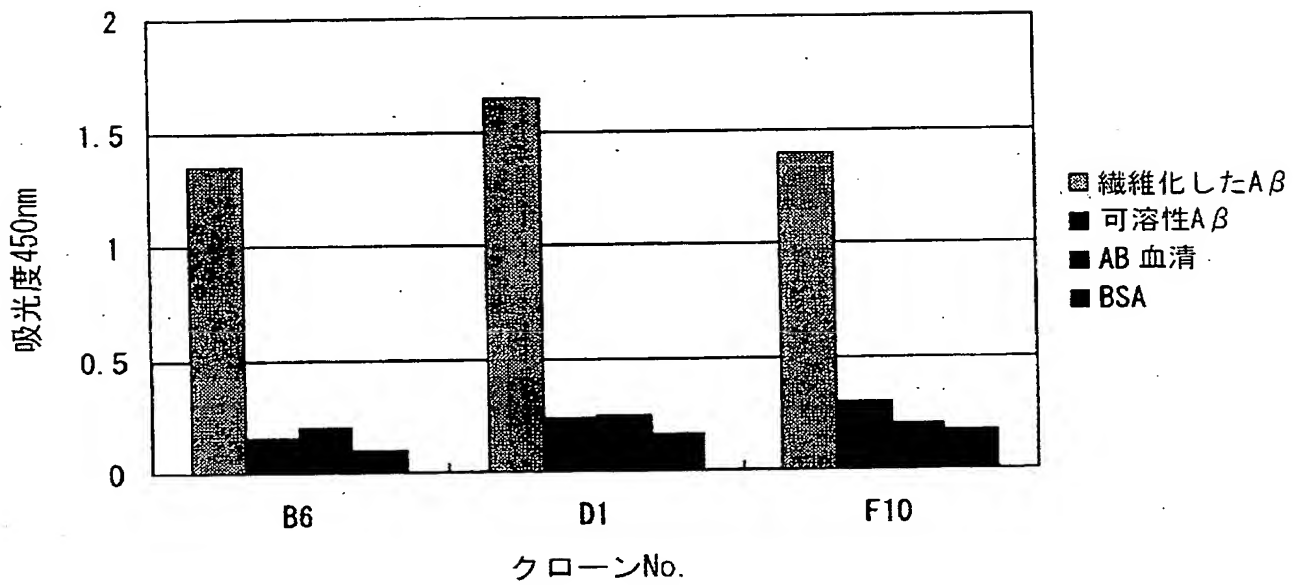
[図6]



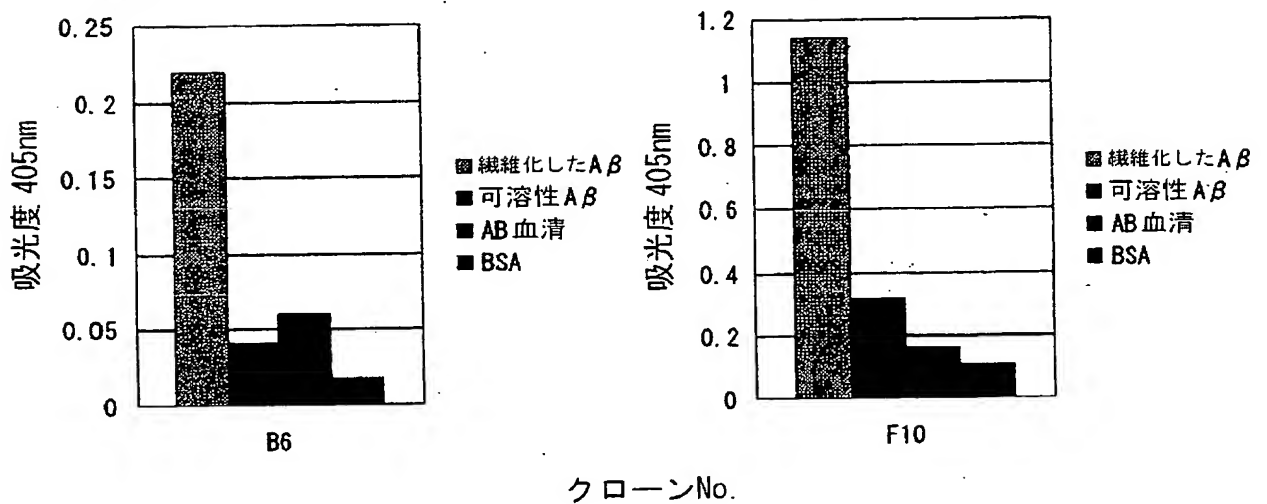
[図7]



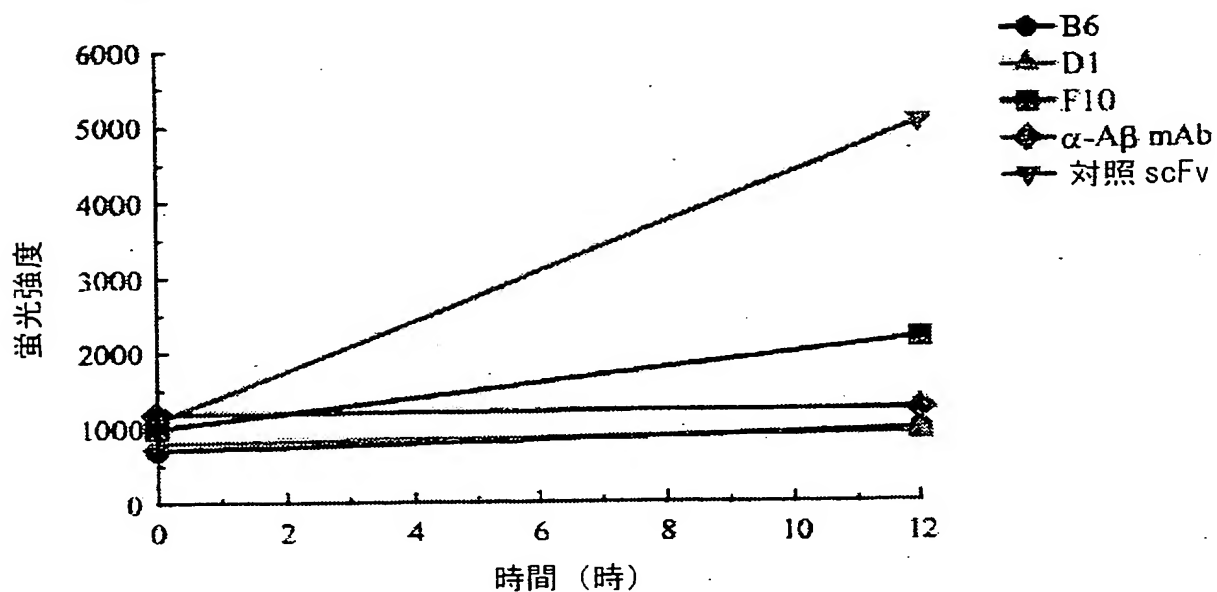
[図8]



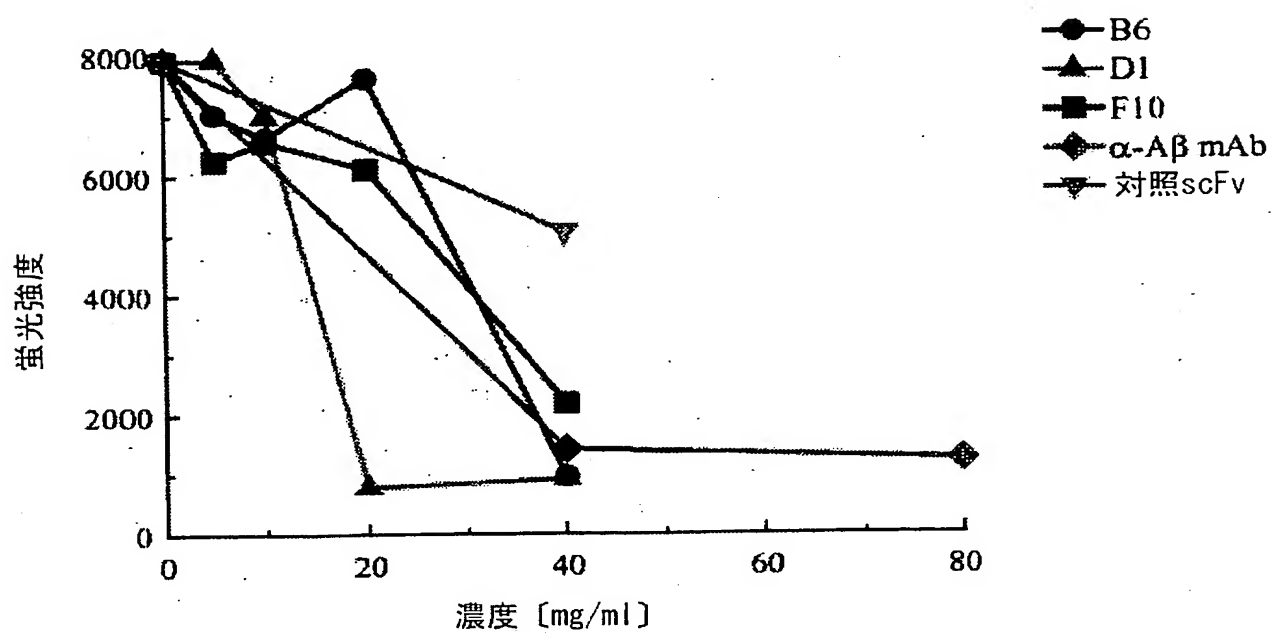
[図9]



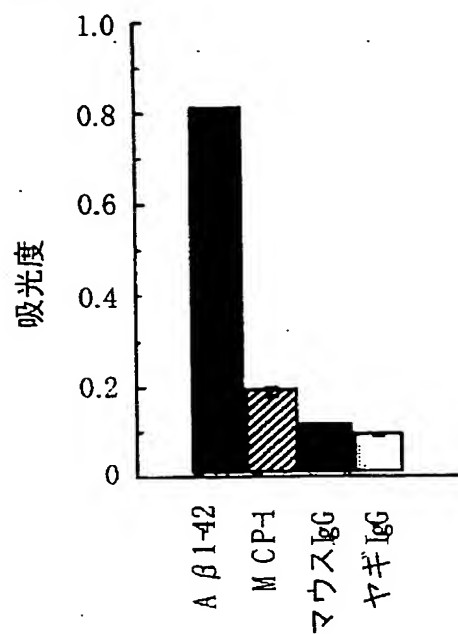
[図10]



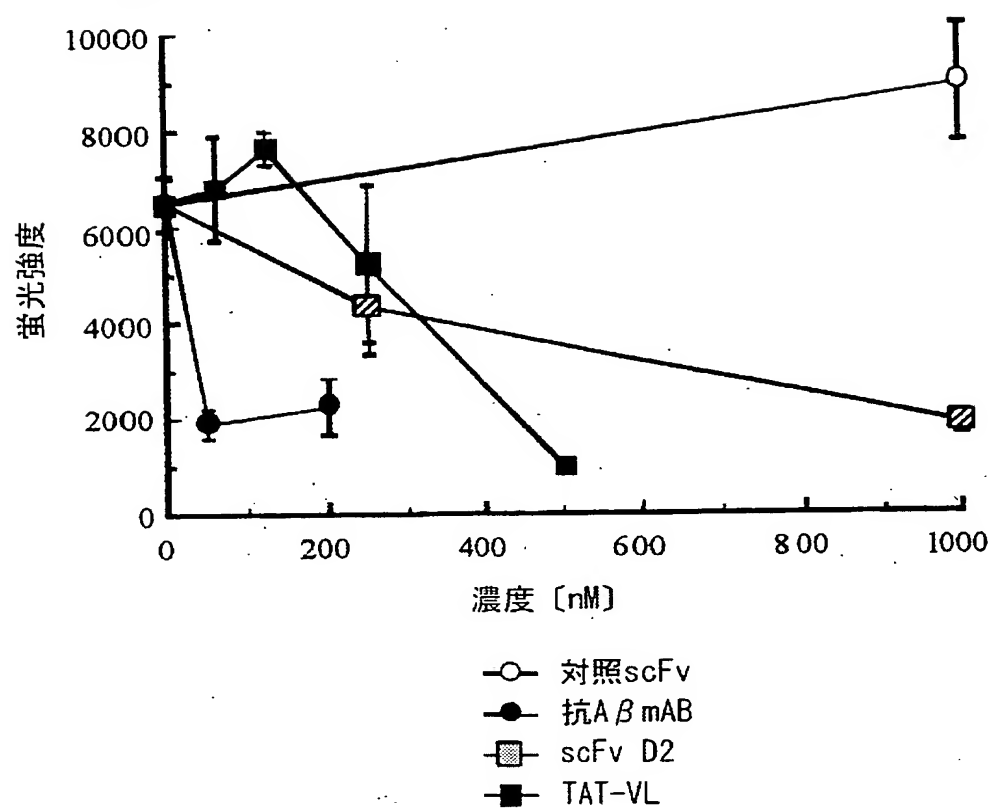
[図11]



[図12]



[図13]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007628

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N15/13, A61K31/7088, 39/395, 48/00, A61P25/28, C07K16/18,  
C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/00, C12P21/08, G01N33/563

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N15/13, A61K31/7088, 39/395, 48/00, A61P25/28, C07K16/18,  
C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/00, C12P21/08, G01N33/563

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTplus (JOIS), PubMed, WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	CAI J. et al., Cloning and expression of human single-chain Fv antibody against amyloid beta peptide involved in Alzheimer's disease., Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. 2003, Vol.25, No.5, pages 557 to 562	<u>1, 22, 24-27,</u> <u>29-30</u> 1-32
Y	FRENKEL, Dan. et al., Modulation of Alzheimer's beta-amyloid neurotoxicity by site-directed single-chain antibody. Journal of Neuroimmunology. 2000, Vol.106, pages 23 to 31	1-32
Y	MANOUTCHARIAN, K. et al., Amyloid-beta peptide-specific single chain Fv antibodies isolated from an immune phage display library., Journal of Neuroimmunology. 2003, Vol.145, pages 12 to 17	1-32

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
21 July, 2005 (21.07.05)

Date of mailing of the international search report  
09 August, 2005 (09.08.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007628

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SOLOMON, Beka. et al., Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996, Vol.93, pages 452 to 455	1-32
Y	JP 2003-523764 A (Washington University et al.), 12 August, 2003 (12.08.03), Full text & WO 200162801 A & AU 200141786 A & EP 1257584 A & KR 2002089359 A & CN 1426423 A & EP 1257584 B1 & DE 60106394 E	1-32
Y	OWENS, Raymond J. et al., The genetic engineering of monoclonal antibodies. Journal of Immunological Methods. 1994, Vol.168, pages 149 to 165	1-32

Form PCT/ISA 4210 (continuation of second sheet) (January 2004)

BNSDOCID: &lt;WO\_2005105998A1\_1&gt;



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/13, A61K31/7088, 39/395, 48/00, A61P25/28, C07K16/18, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/00, C12P21/08, G01N33/563

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/13, A61K31/7088, 39/395, 48/00, A61P25/28, C07K16/18, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/00, C12P21/08, G01N33/563

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JOIS), PubMed, WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	CAI J., et al., Cloning and expression of human single-chain Fv antibody against amyloid beta peptide involved in Alzheimer's disease., Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. 2003, Vol. 25, No. 5, pages 557-562.	1, 22, 24-27, 29-30 1-32
Y	FRENKEL, Dan., et al., Modulation of Alzheimer's beta-amyloid neurotoxicity by site-directed single-chain antibody., Journal of Neuroimmunology. 2000, Vol. 106, pages 23-31.	1-32

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.07.2005

国際調査報告の発送日

09.08.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B

3535

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (2004年1月)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	MANOUTCHARIAN, K., et al., Amyloid-beta peptide-specific single chain Fv antibodies isolated from an immune phage display library., Journal of Neuroimmunology. 2003, Vol.145, pages 12-17.	1-32
Y	SOLOMON, Beka., et al., Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996, Vol.93, pages 452-455.	1-32
Y	JP 2003-523764 A (ワシントン・ユニバーシティ 他) 2003.08.12, 全文 & WO 200162801 A & AU 200141786 A & EP 1257584 A & KR 2002089359 A & CN 1426423 A & EP 1257584 B1 & DE 60106394 E	1-32
Y	OWENS, Raymond J., et al., The genetic engineering of monoclonal antibodies., Journal of Immunological Methods. 1994, Vol.168, pages 149-165.	1-32